Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.
Direktor: Prof. Dr. med. W. Heubner.

Ueber die Veresterung von Phenolen im Darm

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

Vorgelegt von

Peter Marquardt

aus Berlin.

Tag der Promotion: 25. September 1937.

Buchdruckerei Rudolph Pfau, Berlin NW 7, Luisenstraße 21.

M 275

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin.

Dekan: Prof. Dr. Siebeck
Referent: Prof. Dr. Heubner

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

I.

Ueber Ort und Art der Synthese der Aether-Schwefelsäuren besteht eine umfangreiche Diskussion, die durch die Arbeit von Baumann (1) eröffnet wurde. Trotz vieler im folgenden zu besprechender Arbeiten ist man bisher zu keinem einwandfreien Resultat gekommen, und es gibt wohl wenige Streitfragen in der physiologischen Chemie, in denen die Meinungen so hart einander gegenüberstehen. Noch unübersichtlicher wurde das Gebiet durch die Auffindung der Sulfatase, ein aether-schwefelsäure-spaltendes Ferment, das von Neuberg und seinen Mitarbeitern entdeckt wurde und dem keine synthetisierenden Fähigkeiten zuzukommen scheinen. Unter diesen Umständen erscheint es notwendig, die über dieses Gebiet bestehende Literatur kurz zu referieren, um den Sinn der vorliegenden Arbeit klar erscheinen zu lassen.

Im Jahre 1860 wurde von Voit (2) festgestellt, daß nicht aller Schwefel im Harn in Form von Salzen der Schwefelsäure ausgeschieden wird, und 15 Jahre später entdeckte Baumann (3) die „Aether-Schwefelsäuren". Er stellte in der bereits zitierten Arbeit mit Herter fest, daß das dem Organismus von außen zugeführte Phenol wenigstens z. T. als Phenyl-schwefelsäure im Harn auftrat. Baumann beschäftigte sich auch bereits mit dem Ort der Synthese der Aether-Schwefelsäuren. Es zeigte sich nämlich schon in seinen ersten Arbeiten, daß außer dem Phenol noch andere chemische Körper im Organismus zu Aether-Schwefelsäure gepaart werden und daß es sich also hier um einen weit verbreiteten Reaktionsmechanismus im tierischen Organismus handelt. Weiter kam er auf Grund seiner Analysen zu der Ansicht, daß sich das Phenol nicht nur mit Schwefelsäure, sondern auch mit einer anderen ihm

---

1. Ueber die Synthese der Aether-Schwefelsäure und das Verhalten einiger aromatischer Substanzen im Tierkörper. Baumann und Herter, Z. f. physiol. Chemie I, S. 244.

2. Die Gesetze der Ernährung der Fleischfresser. Bischoff und Voit. 1860.

3. Baumann, Pflügers Archiv XII, S. 69: Ueber gepaarte Schwefelsäuren im Harn.

unbekannten Säure verbände, eine Annahme, die von Schmiedeberg (4) durch die Entdeckung der Phenol-Glucuronsäure bestätigt wurde. Baumann wies auch als erster darauf hin, daß diese Bildung der Aether-Schwefelsäure eine Entgiftungsreaktion bedeutet und somit das Vorkommen der gepaarten Schwefelsäuren von größter Bedeutung für die Toxikologie ist. Ueber den Ort, an dem diese Reaktion stattfindet, konnte er Endgültiges nicht mitteilen. Er fand bei Phenol-vergifteten Hunden (5) vorübergehend eine starke Vermehrung der Phenole in der Leber und zwar konnte er in einem Fall aus 100 Gewichsteilen Leber 19 mal so viel Tribromphenol gewinnen wie aus 100 Gewichtsteilen Blut. Er fand aber bei weitem nicht die dieser Menge aequivalente Schwefelsäuremenge in der Leber, und gerade dieser Befund führte ihn zu der eben erwähnten Annahme, daß noch eine andere Säure beteiligt sein müsse, die, wie schon gesagt, von Schmiedeberg dann als Glucuronsäure erkannt wurde. Weiter unterband er dann gemeinsam mit Christiani bei Phenol-vergifteten Tieren die Nierenarterien und -venen (6) und konnte danach feststellen, daß die Menge der Phenyl-Schwefelsäure nicht vermindert war, woraus mit Sicherheit (beim Hunde) nur hervorgeht, daß die Niere nicht der ausschließliche Sitz der Reaktion sein kann. Nach anderer Methode arbeitete Kochs (7 und 8). Er zerkleinerte die Organe (Kalb und Hund) mit der Hackmaschine, fügte dem Organbrei Blut von derselben Tierart hinzu, digerierte das Gemenge unter Zusatz von Phenol und Natriumsulfat teils bei 36° und teils bei 8°—12° im Luftstrom. Er untersuchte Leber, Niere, Pankreas, Muskel und Thymus. An den vier erst genannten Organen erhielt er positive Resultate, an der Thymus ein völlig negatives. Landi (9) wiederholte die Versuche von Kochs mit der Leber. Er konnte im Gegensatz zu Kochs die Synthese nicht beobachten, da der eintretende Fäulnisprozeß die Untersuchung störte — ein Faktor, der sicher auch die Versuche von Kochs beeinflußt hat und

---

4. Schmiedeberg, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. XIV, S. 307: Ueber Oxydation und Synthesen im Tierkörper.

5. Baumann, Pflügers Archiv XIII, S. 297.

6. Christiani und Baumann, Z. f. physiol. Chemie II, S. 350: Ueber den Ort der Bildung der Phenol-Schwefelsäure im Tierkörper.

7. Kochs, Pflügers Archiv XX, S, 64.

8. Kochs, Pflügers Archiv XXIII, S. 161.

9. Landi, 7. Kongreß für innere Medizin Rom 1896: Beitrag zur Kenntnis der Phenyl-Schwefelsäure im Organismus.

dazu zwingt, seine Resultate mit Vorsicht zu beurteilen. Landi fand keine Synthese. Er machte dann Versuche mit künstlicher Zirkulation durch den Darm und schloß daraus, daß nicht die Leber, sondern der Darm der Sitz der Synthese sei, eine Ansicht, die von Embden und Gläßner (10) gleichfalls im Durchströmungsversuch nicht bestätigt werden konnte. Diese Autoren kamen auf Grund ihrer Versuche, die mit Blut, dem Phenol und Sulfat zugesetzt worden war, an den verschiedensten Organen durchgeführt wurden, zu dem Resultat, daß geringe Mengen in Niere und Lunge und die Hauptmengen in der Leber gebildet werden. Darm und Muskel kommt nach ihren Versuchen für die Synthese überhaupt nicht in Frage. Im krassen Gegensatz dazu fand Lang (11), daß die Aether-Schwefelsäuren nach Leberexstirpation nicht fehlen. Diese Versuche von Lang wurden von Minkowski (12), der bei entleberten Gänsen Aether-Schwefelsäure nachwies, bestätigt. Minkowski hält es für wahrscheinlich, daß diese Paarung eine allgemeine Funktion der Körpergewebe sei und die Leber dabei keine andere Rolle spiele als jedes andere Organ. Dieser Ansicht widerspricht wieder der vorhin zitierte Befund von Kochs, daß die Thymusdrüse — er verwendet junge Tiere, bei denen diese Drüse noch nicht zurückgebildet ist — keine Synthese herbeiführt. Schließlich untersuchte noch Satta (13) den Gehalt verschiedener Organe von Phenol-vergifteten Hunden an gepaarten Schwefelsäuren. Leider untersuchte er nicht den Darm, sondern nur den Magen, in dem er nur unbedeutende Mengen fand, die bei weitem größte Menge fand er in der Leber. Lade (14) hinwiederum, der wieder die Aether-Schwefelsäureausscheidung nach Leberausschaltung untersuchte, kam wie Lang und Minkowski zu dem Resultat, daß die Leber keine Rolle für die Synthese spielen könnte.

Ich glaube hiermit zur Genüge dargelegt zu haben, daß meine Behauptung über die krassen Gegensätze zwischen den einzelnen Autoren in dieser Frage zu Recht besteht und kann es mir wohl sparen, noch einige andere Arbeiten derselben Zeit, die mal die

10. Embden und Gläßner, Hofmeisters Beiträge I, S. 310.

11. Lang, Z. f. physiol. Chemie XXIX, S. 305: Ueber die Schwefelausscheidung nach Leberexstirpation.

12. Minkowski, Ergebnisse der allgem. Path. u. path. Anatomie 1887, S. 740, Fußnote. Störung der Leberfunktion.

13. Satta, referiert in den Jahresberichten der Tierchemie 1908, Band 38, S. 587.

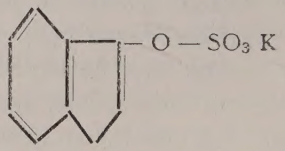
14. Lade, Z. f. physiol. Chemie, Band 79, S. 326.

eine und mal die andere hier referierte Meinung mit gleichen oder ähnlichen Methoden vertreten, wiederzugeben. In der letzten Zeit hat die Diskussion über diese Frage völlig aufgehört, bis Neuberg und seine Mitarbeiter an dieses Problem von einer ganz anderen Seite herantraten. Sie haben sich nicht mit der Synthese beschäftigt, sondern sie haben ein Ferment gesucht und gefunden, daß die Schwefelsäure-Ester der Phenole von der allgemeinen Formel.

$$R—O—SO_3H$$

bezw. deren Alkalisalze in seine beiden Bestandteile teilt. Dieses Ferment ist in der Tier- und Pflanzenwelt reichlich vertreten. (15, 16, 17, 18). Das Ferment ist bequem zu erhalten aus der Takadiastase, einem Trockenpräparat aus Aspergillus Oryzae, es ist vollständig löslich in Wasser und kann in fester Form der Versuchslösung zugefügt werden; es kann aber auch, ohne daß die spaltende Kraft des Materials vermindert wird, eine wässerige Lösung unter Zusatz von Toluol, um die Sterilität zu wahren, hergestellt werden; eine etwa entstehende Trübung kann ohne Schaden für die Wirkung filtriert werden. Ueber die Herstellung der Sulfatasepräparate aus Organen s. Neuberg und Simon (19).

Für das Auge sichtbar kann man sich die Sulfatasewirkung auf folgende Weise machen (20): Man läßt auf indoxylschwefelsaures Kalium



Sulfase einwirken; das durch Spaltung frei werdende Indoxyl geht

---

15. Neuberg und Kurono, Biochem. Z. 140, S. 295: Ueber die enzymatische Spaltung der Phenol-Aether-Schwefelsäure.

16. Neuberg und Simon, Biochem. Z. 156, S. 365: Tierische Sulfatase.

17. Rosenfeld, Biochem. Z. 157, S. 434: Ueber das Vorkommen und Verhalten der Sulfatase in menschlichen Organen.

18. Nakamura, Biochem. Z. 175, S. 226: Ueber das Verhalten der Lipase und das Vorkommen von Phosphatase und Carboxylase in der Haut.

19. Neuberg und Simon, 1. c.

20. Neuberg und Wagner, Biochem. Z. 161, S. 498: Ueber die Spaltbarkeit von Aether--Schwefelsäuren der verschiedenen Reihen durch Sulfatase und über den Mechanismus der Sulfatasewirkung.

teilweise in Indigo über und erteilt so der Lösung bald eine grüne Farbe. Später fällt der Farbstoff in blauen Flocken aus und verleiht auch der zur Wahrung der Sterilität zugesetzten Toluolschicht eine rötliche Färbung. Gewöhnlich wird man zur Vermeidung einer unspezifischen Zersetzung, wie sie sehr leicht durch die bei der Spaltung der Ester frei werdende Schwefelsäure eintreten kann, ein Neutralisationsmittel hinzusetzen. Neuberg verwendet meistens Calciumkarbonat. Bei Verwendung dieses Calciumkarbonates ist zu beachten, daß die abgespaltene Schwefelsäure z. T. als Gips ausfällt, während die Calciumsalze der unzerlegten Ester-Schwefelsäure in Lösung verbleiben. Diese Neubergsche Sulfatase verliert ihre Wirkung, wenn sie längere Zeit erhitzt wird. Außer indoxylschwefelsaurem Kalium sind zerlegbar durch Sulfatase die Ester-Sulfate des p-Kresols, der 3 isomeren Mono-Nitrophenole, der Chlor-Phenole, des p-Bromphenols, des Carvakrols, des Vanillins, der p-Oxybenzoesäure, des Hydrochinons, des β-Naphthols (21) und des o-Oxychinolins, also des Stoffes, dessen Ester-Schwefelsäure im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit behandelt ist (22). Es ist wichtig, hervorzuheben, daß im Gegensatz zu den Ester-Sulfaten der aromatischen Reihe die der aliphatischen und hydroaromatischen Reihen z. B. die Ester-Kaliumsalze der Aethylschwefelsäure, der Borneol-Schwefelsäure, der m-Methyl-cyclohexanol-Schwefelsäure von der Takasulfatase nicht zerlegt werden (23).

Hier sei noch bemerkt, daß die aromatischen Aetherschwefelsäuren, denen wohl die größte physiologische Bedeutung zukommt, chemisch außerordentlich beständige Körper sind. Als wesentlicher Unterschied gegenüber den gewöhnlichen Estern ist hervorzuheben, daß sie der Einwirkung siedender Alkalien widerstehen; auch in neutraler Lösung sind sie beständig und häufig sind sie es sogar noch in Gegenwart organischer Säuren. Fäulniserreger greifen sie nur wenig an. Hingegen kann die Autolyse eine gewisse Spaltung herbeiführen. Neuberg und Simon (16) geben z. B. folgenden Versuch an: 17,5 g Leberbrei, in 150 ccm Wasser suspendiert, wurden nach fünftägiger Autodigestion eine halbe Stunde lang im Wasserbad gekocht, sodann wurden 1,5 g phenolschwefelsauren Kaliums + 1,5 ccm Toluol hinzugefügt. Nach Verlauf von 5 Tagen konnte eine bis zu 4% gehende Spaltung festgestellt werden.

21. Noguchi, Biochem. Z. 144, S. 138: Sulfatase IV.
22. und 23. Neuberg und Wagner 1. c. siehe 20.

Für die Sulfatasewirkung scheint das Optimum nahe am Neutralpunkt zu liegen, denn weder durch Pufferung mit saurem Acetatpuffer (24) noch durch basische Phosphatpuffer (23) läßt sich die Fermenttätigkeit steigern. Eine Förderung der enzymatischen Hydrolyse wird durch das zur Vermeidung der bakteriellen Zersetzung hinzugesetzte Toluol bewirkt, durch welches freies Phenol aus der wässerigen Lösung entfernt wird, wenn auch nur zu einem kleinen Teil, denn es wird ja nicht ausgeschüttelt. Da die Takasulfatase das myronsaure Kalium oder Sinigrin nicht angreift, während es durch tierische Organe sulfatatisch leicht gespalten wird, weist Neuberg (25, 26) darauf hin, daß möglicherweise das auf das ester-schwefelsaure Kaliumsalz des Allylsenföl-Glykosids wirkende animalische Agens als eine Thio-Glykosid-Sulfatase von der eigentlichen Phenol-Sulfatase zu unterscheiden sei.

Auf diese Möglichkeit noch anderer Sulfatasen als der Takasulfatase, auf die schon Neuberg in diesem Falle hingewiesen hat, möchte ich besonders aufmerksam machen, da es sich im Verlaufe dieser Arbeit zeigen wird, daß eine Synthese der Ester-Schwefelsäure — untersucht am o-Oxychinolin — mit Sulfatase, gewonnen aus dem Darm nach der Neubergschen Vorschrift, nicht möglich ist. Außerdem ist gerade an der Stelle, an der, wie im experimentellen Teil gezeigt werden wird, eine Synthese zu erreichen ist, nach einer Tabelle von Rosenfeld (27) der Gehalt an Sulfatase besonders gering. Rosenfeld untersuchte die Spaltungsfähigkeit von Organen, die von Männern, die durch Selbstmord oder Schlaganfall verstorben waren, stammten. Ohne Organextrakte als Fermentzusatz erhielt Rosenfeld in keinem Fall eine Spaltung.

---

24. Neuberg und Linhardt, Biochem. Z. 142, S. 191: Ueber Sulfatase.

25. Neuberg und Wagner, Biochem. Z. 174, S. 457: Ueber die Verschiedenheit der Sulfatase und der Myrosinase.

26. Neuberg und Wagner, Z. f. exp. Med. 56, S. 334: Ueber die Zerlegung des myronsauren Kaliums durch animalische Sulfatase.

27. Rosenfeld, Biochem. Z. 157, S. 436: Ueber das Vorkommen und Verhalten der Sulfatase in menschlichen Organen.

(27) Spaltung von phenol-aether,schwefelsaurem Kalium bei 37° in %

Organ:	nach 2 Tagen:	nach 18 Tagen:
Niere	4,56	26,78
Gehirn	10,61	26,58
Leber	3,76	18,55
Duodenum	——	15,84
Nebenniere	2,64	12,43
Milz	——	11,14
Lunge	1,05	11,08
Muskel	1,98	7,55
Dünndarm	——	7,18
Pankreas	1,85	5,83

Die Entdeckung der Sulfase, dieses spaltenden Fermentes, hat natürlich keine Klärung der Frage der Synthese gebracht. Sie hat gezeigt, daß in fast allen tierischen Organen jedenfalls ein chemischer Vorgang, nämlich der der Spaltung, möglich ist und daß darum auch, wenn auch vielleicht in ganz beschränktem Umfang, dort Synthesen möglich sein können und hat insofern etwas Licht in das Dunkel der vorher referierten Arbeiten gebracht. Aber die primäre Frage nach der Entstehung ist nicht angerührt worden. Der Zweck der vorliegenden Mitteilung ist es nun, sich mit dem Ort und der Art dieser Synthese zu beschäftigen. Es schien am meisten wahrscheinlich, diese Synthese im Darm zu vermuten, denn schließlich entstehen Phenole bei der Eiweißfäulnis im Darm, und man hat in der klinischen Medizin die Ausscheidungsgröße an Aetherschwefelsäuren immer als Maß für den Grad der Darmfäulnis angesehen. Hoppe-Seyler (28) hat alle diese Beobachtungen in dem Satz zusammengefaßt: „Die Ausscheidung der Aether-Schwefelsäuren geht parallel mit der Steigerung aller Prozesse, welche die Dünndarmverdauung ändern.“ Diese Annahme, daß die Synthese vorwiegend im Darm vor sich geht, scheint aus dem eben Gesagten wahrscheinlich zu sein, und ich hoffe, sie im experimentellen Teil dieser Arbeit bewiesen zu haben. Als Beispiel eines Phenols wurde das Oxychinolin gewählt, denn für dieses hatte Grabbe (29) in zwei Versuchen festgestellt, daß es z. T. schon im Lumen des Dünndarms in den Schwefelsäure-Ester verwandelt wurde und daß bei Gallen-

28. Hoppe-Seyler, Z. f. physiol. Chemie XXII, S. 1.

29. Grabbe, Arch. f. exp. Path. u. Pharm 137, S. 96: Untersuchungen über Oxychinolin.

fistelhunden die Galle absolut frei von gebundenem Oxychinolin ist. Des weiteren hatte er festgestellt, daß die Oxychinolin-Schwefelsäuremengen, die er bei seinem ersten Versuch im Dickdarm vorfand, im Dickdarm nicht auftraten, wenn er den Dünndarmausgang am Tage vor dem Versuch unterband. Also findet eine Wiederausscheidung in den Dickdarm nicht statt. Die Ausscheidung erfolgt in der Hauptsache durch die Nieren. Dabei ist es gleichgültig, ob das Oxychinolin oral oder subcutan gegeben wird. Grabbe fand das Oxychinolin in seinen beiden Versuchen mit Schwefelsäure gepaart, während andere Autoren (30, 31) Oxychinolin-Glucuronsäure fanden. Diese Befunde von Grabbe machen die soeben aufgestellte Hypothese über den Ort der Synthese bereits sehr wahrscheinlich und spezifizieren Darm in Dünndarm. In unveröffentlichten Versuchen im Berliner Pharmakologischen Institut konnte von Henry Ungar der Befund von verestertem Oxychinolin im Darmlumen bestätigt werden, aber nicht der von gebundenem Sulfat. Es gelang Ungar auch nicht, bei Verwendung eines Rohextraktes aus einer mit Seesand und Kochsalzlösung fein verriebenen Mucosa in vitro eine Paarung von Oxychinolin und Schwefelsäure zu erreichen. Diese Paarung mißlang ihm auch unter Zusatz von Takasulfatase.*

Da Grabbe und Unger gepaarte Säuren im Darm fanden, bleibt die Frage offen, ob die Veresterung in der Darmschleimhaut vor sich geht oder durch ein in das Darmlumen ausgeschiedenes Ferment bewirkt wird. Die Veresterung in der Schleimhaut ist sehr unwahrscheinlich, da Unger in der Darmschleimhaut eines mit Oxychinolin gefütterten Hundes nach Verseifung nur Spuren brombindender Substanz fand. Für die Existenz des demnach anzunehmenden zellfreien Fermentes wäre es beweisend, wenn man diesen Vorgang — Ungar ist es mißglück — im Reagensglas durchführen könnte. Des weiteren ist zu untersuchen die Beziehung dieses postulierten Fermentes zur Neubergschen Sulfatase und die Frage, ob Schwefelsäure-Ester oder Glucuronsäure-Ester im Darm vorliegt.

---

30. Rost, Arb. d. K. Ges. A. 1899, Band 15.

31. Brahm, Z. f. physiol. Chemie, Band 28, S. 439.

* Für die Ueberlassung dieses und einiger anderer Präparate möchte ich nicht verfehlen, Herrn Professor Dr. Neuberg, Berlin-Dahlem, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Die Spaltbarkeit des gepaarten Oxychinolins brauchte nicht eingehend untersucht zu werden, denn wie schon Grabbe betont, spalten sich die gepaarten Oxychinolin-Derivate bei 37° und einem p_h von etwa 7 bereits allmählich, so daß im Körper immer mit einer gewissen Menge von freiem Oxychinolin dort gerechnet werden muß, wo gepaartes Oxychinolin vorliegt, eine chemische Forderung, die ich in einem Tierversuch (Versuch 10) voll bestätigen konnte. Diese Tatsache muß auch bei der Beurteilung meiner Analysenresultate berücksichtigt werden, denn meine ganzen Modellversuche wurden unter physiologischen Bedingungen ausgeführt, also unter Bedingungen, unter denen der angestrebte Vorgang der Paarung aus den eben dargelegten Gründen ausgesprochen erschwert war.

II. Methode.

A. Isolierung des freien und gebundenen Oxychinolins aus dem Darminhalt:

Der Darm eines frisch getöteten Tieres wurde unterhalb des Pylorus und oberhalb des Coecums unterbunden. Der Inhalt wurde ausgequetscht, der Darm mit später beschriebenen Lösungen ausgespült, in sie eingelegt und einige Zeit bei 0° aufgehoben, um die Extraktion des Oxychinolins vollständig zu machen. Die Zeit ist bei den Versuchen angegeben; es zeigte sich aber, daß sie anscheinend keine große Rolle spielt (Tab. I.). Danach wurde der Darm aus der Lösung entfernt, die Spülflüssigkeit und der Darminhalt mit ihr vereinigt, zur Bestimmung des freien Oxychinolins bikarbonatalkalisch gemacht und mindestens 7 Stunden im Kempfschen Apparat mit Aether extrahiert, in den unter diesen Bedingungen das freie Oxychinolin übergeht.

Zur Bestimmung des veresterten Oxychinolins wurde der Rückstand der Aetherextraktion bis zu 2% mit Salzsäure versetzt, kurz auf der Heizplatte erwärmt, bis der Geruch nach Aether verschwunden war, dann 1½ Stunden zur Spaltung des Esters am Rückflußkühler gekocht, wieder bikarbonatalkalisch gemacht und mit Aether im Kempfschen Apparat mindestens 7 Stunden extrahiert. Dieser aetherische Extrakt enthielt den Oxychinolinteil des Esters in der Form von freiem Oxychinolin. Die Aetherextrakte wurden gesondert weiter verarbeitet, der Aether abdestilliert, der Rückstand

mit etwas Salzsäure aufgenommen und verdünnt, bis die Lösung höchstens 3% salzsauer war.

Da diese Lösung mitunter milchige Trübungen zeigte, die darauf hinwiesen, daß Stoffe, wahrscheinlich Fette, kolloid in Lösung gegangen waren, wurde die Methode im Verlauf der Arbeit so verändert, daß erst mit 10% Salzsäure aufgenommen, kurz (1 Min.) mit Aether durchgeschüttelt und danach verdünnt wurde. Es wurde dadurch bewußt durch Verlust von Oxychinolin die Möglichkeit eines geringen Fehlers geschaffen, um mit Sicherheit ausschließen zu können, daß bei quantitativer bromometrischer Bestimmung des Oxychinolins etwa die Bromzahl von Fetten mitbestimmt worden wäre. Bei einzelnen Versuchen ist dies Ausschütteln unterlassen worden. Im Verlauf der Arbeit wurde das mit: „(nicht ausgeschüttelt)" markiert.

B. Quantitative Bestimmung des Oxychinolins:

Ungar hatte festgestellt, daß die kolorimetrische Auswertung der Eisenchloridreaktion des Oxychinolins trotz ihrer Empfindlichkeit zur quantitativen Bestimmung nur schlecht verwertbar ist. Einmal verändert die Vergleichslösung an der Luft schon nach 10 Minuten ihre Farbe, dann war es auch schwierig, die salzsaure Lösung des Rückstandes vom Aetherextrakt so genau zu neutralisieren, wie es zur Bildung eines brauchbaren Reaktionsproduktes nötig ist; denn bei deutlich alkalischer Reaktion tritt Fällung auf, bei mehr saurer wird die Reaktion in der Farbe verändert oder überhaupt verhindert. Als geeignete Methode wurde von Ungar folgende gewählt, die den Bergschen Oxychinolinbestimmungen nachgebildet ist und (32) dort bei einer Bestimmung von Magnesium angegeben ist. Danach wird das Oxychinolin nach Art der Phenole bromometrisch exakt titriert. Es wird (33) Bromat-Bromid-Lösung hinzugesetzt, wobei sich glatt das 5,7-Dibromoxychinolin bildet gemäß folgender Gleichung:

$$C_9H_7ON + 4\ Br = C_9H_5Br_2ON + 2\ HBr.$$

---

32. Berg, Z. f. analyt. Chemie 71, S. 23.
33. Berg. pharm. Zeitung 71, S. 1542.

Zweckmäßiger als das Ende der Reaktion mit Indigocarmin, einem Indikator, der durch überschüssiges Brom entfärbt wird, zu ermitteln, ist es, den Bromüberschuß jodometrisch zu titrieren.

Es ist bei weitem besser, die Bestimmung massanalytisch und nicht gewichtsanalytisch, z. B. als Magnesium-Oxychinolin-Verbindung, die bei 100° getrocknet die Zusammensetzung:

$$Mg\ (C_9H_6ON)_2 \cdot 2\ H_2O$$

hat, durchzuführen. Absorptionserscheinungen, die noch dazu hier in biologischen Lösungen besonders leicht auftreten könnten, werden vermieden, da ja immer nur das Oxychinolin auf Grund seines Phenolcharakters titriert und aus dem Verbrauch an Brom berechnet wird.

Zur Ausführung der Bestimmung sind erforderlich:

Bromkali	(in Substanz)
Kaliumbromat	1/100 n
Kaliumjodid	20%
Natriumthiosulfat	1/100 n
Stärkelösung.	

Ausführung:

Die oxychinolinhaltige salzsaure Lösung wird mit KBr und so lange mit gemessenen Mengen Kaliumbromat versetzt, bis eine deutliche Verdunklung des gelben Farbtons eintritt. Die Lösung muß dann in einer mit Glasstöpsel verschlossenen Flasche 15 Minuten stehen. Danach wird Jodkali und Stärke hinzugefügt und das überschüssige Brom durch Titration des Jods mit Thiosulfat ermittelt.

Berechnet wurde nur auf freies Oxychinolin: 1 ccm verbrauchtes Bromat entspricht 0,363 mg Oxychinolin. 1 g Schwefelsäure-Halb-Ester entspricht 0,653 g Oxychinolin.

C. Bestimmung des gebundenen Sulfats:

Um die bei der Hydrolyse frei werdende Sulfatmenge bestimmen zu können, mußte zuerst, evtl. vor der Hydrolyse, schon vorhandenes Sulfat entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde die von Neuberg bei seinen Sulfatase-Arbeiten verwendete Methode benutzt. Dabei wird das freie Sulfat mit einer Bariumlösung gefällt, die sich aus einem Teil 20%iger $BaCl_2$ und zwei Teilen conc. $Ba(OH)_2$ zusammensetzt. Die Fällung geschieht bei Zimmertemperatur. Man

läßt die Lösung 24 Stunden stehen und kann danach erst den Niederschlag abfiltrieren und den Ester im Filtrat in der beschriebenen Weise verseifen.

(Bei der Verseifung ist darauf zu achten, daß keine Tonstücke als Siedesteine verwendet werden, da der Ton sulfathaltig ist.)

Danach wird das gebundene Oxychinolin, wie beschrieben, und das gebundene Sulfat nach der eben angegebenen Fällungsmethode bestimmt; der Niederschlag von Bariumsulfat wird in einen Mikrofiltertiegel gesaugt, bis zum Verschwinden der Cl-Reaktion mit Wasser ausgewaschen, bis zur Konstanz geglüht und gewogen.

1 g $BaSO_4$ entspricht 0,952 g Ester.

Es scheint unmöglich zu sein, in einem und demselben Versuch übereinstimmende Werte für verestertes Oxychinolin und gebundenes Sulfat zu bekommen, denn während der Hydrolyse flockt ein Teil der Eiweißkolloide aus und wird mit dem $BaSo_4$-Niederschlag in den Tiegel gesaugt. Diese Menge wurde mitunter so groß, daß ein Makrofiltertiegel benutzt werden mußte. Es ist leicht verständlich, daß unter diesen Bedingungen das aus dem Ester frei gewordene Oxychinolin partiell an den Niederschlag adsorbiert und damit aus der Lösung genommen wird, so daß seine auf die Filtration des Bariumsulfates folgende Bestimmung zu niedrige Werte liefern muß, eine Forderung, die sich im Verlauf der Analysen voll bestätigt hat.

Da der Ester recht stabil ist (siehe die Spaltungsversuche Nr. 14 u. 15), lag es nahe, den genannten Fehler durch Enteiweißen auszuscheiden. In einem Kontrollversuch (Versuch I) wurde Hühnereiweiß mit 5,35 mg Oxychinolin und 48,3 Phenylschwefelsäureester in gesättigter Kochsalzlösung bis kurz vor dem Sieden erhitzt, durch ein gewöhnliches Filter abfiltriert, zweimal mit dem gleichen Volumen heißer gesättigter Kochsalzlösung nachgewaschen, dann bikarbonatalkalisch gemacht, über Nacht extrahiert, der ätherische Extrakt abdestilliert und der Rückstand mit salzsaurem Wasser aufgenommen. Da daraufhin die Lösung nicht klar war (Lipoide), wurde noch einmal bei saurer Reaktion 5½ Stunden extrahiert und die danach klare Lösung wie bisher titriert.

Es ergaben sich:

Freies Oxychinolin: 5,14 mg.

(= 96% der Einwage). (Nicht ausgeschüttelt).

Die extrahierte Lösung wurde bis zu *2%* mit Salzsäure versetzt, 1½ Stunden hydrolysiert, bikarbonatalalkalisch gemacht und über Nacht erneut extrahiert.

Es ergaben sich:

16 mg Phenol aus dem Schwefelsäureester.

(= *33%* der Einwage.) (Nicht ausgeschüttelt.)

Das freie Oxychinolin ist also fast gar nicht, der Ester hingegen sehr stark am Eiweiß verloren gegangen. Daher läßt sich die Eiweißentfernung und die dadurch erhoffte Verbesserung der Methode nicht durchführen.

Die Methode der Bromtitration erfaßt jedes Phenol. Bei ihrer Anwendung auf Oxychinolin mußte zuerst festgestellt werden, ob überhaupt, und wenn, in welchen Größenordnungen im Darm eines nicht mit Oxychinolin gefütterten, nüchternen Tieres Substanzen anzutreffen sind, die mit der beschriebenen Methode erfaßt werden.

Zu diesem Zweck wurden 4 Katzen und 2 Hunde getötet und der Darminhalt, wie angegeben, untersucht.

Es ergab sich:

Tab. I.

Titrationswerte berechnet auf mg Oxychinolin.

Versuchs-Nr.	Einlegeflüssigkeit	Dauer des Einlegens	Versuchstier	Oxychinolin: frei	Ester
2	2% Essigsäure	48 Std.	Katze 1	2,413	0,821
3	2% Essigsäure	19 Std.	Katze 2	0,416	2,081
4	Phosphatpuffer p_h 5	24 Std.	Katze 3	0,000	2,412
5	Phosphatpuffer p_h 5	24 Std.	Katze 4	0,065	0,640
6	Phosphatpuffer p_h 5	53½ Std.	Hund 1 (Gewicht: 25 Kilo)	0,497	0,806
7	Phosphatpuffer p_h 5	53½ Std.	Hund 2 (Gewicht: 7,5 Kilo)	verloren	0,639

Bemerkungen zu Tab. I:

Um den höchst möglichen Titrationswert zu erreichen, wurde bei allen in Tab. I angeführten Versuchen „nicht ausgeschüttelt".

Zur besseren Uebersicht wurde hier nur auf mg Oxychinolin berechnet.

Wie man aus der Tab. I ersieht, ergeben die Werte kein gleichmäßiges Bild und lehren für die Beurteilung der folgenden eigentlichen Versuche, daß man nur größere Effekte als beweiskräftig ansehen darf.

III.

Um Grabbes Befund von verestertem Oxychinolin im Darm des Hundes nach Fütterung des Phenols noch einmal zu sichern (Versuch 8), wurde ein nüchterner Hund mit 1 g Oxychinolin gefüttert und nach 5 Stunden die zweite Hälfte des Duodenums und das erste Drittel des Jejunums entnommen, der Darminhalt entleert und mit 1%iger Essigsäure ausgespült. Darminhalt und Spülflüssigkeit wurden vereinigt und in der beschriebenen Weise auf freies und verestertes Oxychinolin und auf gebundenes Sulfat untersucht. (Da während der Hydrolyse sehr viel Eiweiß ausgefallen war, das beim Glühen verascht wurde, wurde der Niederschlag mit 5%iger Salzsäure und danach mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der Cl-Reaktion ausgewaschen, um etwaige Verunreinigungen vor der Wägung des Sulfats möglichst zu entfernen).

Ergebnis des Versuchs 8,
berechnet auf mg Oxychinolin und Sulfat:
(Nicht ausgeschüttelt).

Oxychinolin: frei: 1,40
geb.: 2,28
Sulfat (SO_4) : 4,60
(geb. Oxychinolin berechnet auf Ester: 3,50).

In diesem Versuch ist also verestertes Oxychinolin gefunden worden und ebenso gebundenes Sulfat. Allerdings hätte der Menge von Oxychinolinester bedeutend weniger Sulfat entsprochen. Es ist also zu viel Schwefelsäure gefunden worden, ein Befund, der sich schon bei Grabbe findet, sich im Verlaufe dieser Arbeit wiederholt und der dem, was bei der Beschreibung der Methode über Adsorption angenommen wurde, durchaus recht gibt.

Der Veresterungseffekt wurde noch einmal bei einer Katze untersucht (Versuch 9). Leider konnte in diesem Falle keine Sulfatbestimmung durchgeführt werden, weil dieser Darminhalt nicht durch einen Filtertiegel zu filtrieren war. Eine nüchterne Katze bekam durch einen Magenschlauch 1,45 g Oxychinolin (0,5 g pro Kilo), in wenig HCl gelöst, 0,1 g Natriumsulfat und 0,1 g Takasul-

fatase, die sich nicht vollständig überspülen ließ. Nach 1½ Stunden wurde die Katze getötet, das Duodenum und zwei Drittel des übrigen Dünndarms entnommen, ausgedrückt, aufgeschnitten und eine Stunde in 1%iger Essigsäure gelegt. Dann wurde der Darm herausgenommen und beide Flüssigkeiten vereinigt. Da die Menge zu groß war, um im Extraktionsapparat verarbeitet zu werden, wurde sie 8 Tage in einem Schwefelsäure-Exsikator unter Vakuum eingeengt und dann in der üblichen Weise verarbeitet.

Ergebnis, berechnet auf mg Oxychinolin:
(nicht ausgeschüttelt) (Versuch 9)
frei: 1,92

Oxychinolin:

geb.: 5,58
(geb. Oxychinolin, berechnet als Ester: 8,55 mg.)

Betrachtet man die beiden Versuche, so kann an der Veresterung des Oxychinolins wohl nicht gezweifelt werden. Der Sulfatbefund macht die Veresterung mit Schwefelsäure wahrscheinlich.

Grabbe hatte im Harn bei 37° festgestellt und danach für den Organismus gefordert, daß stets ein kleiner Teil des Oxychinolins im Organismus frei bleiben muß, da bei dieser Temperatur und neutraler Reaktion die gepaarten Oxychinolinderivate bereits allmählich wieder gespalten werden. Dies konnte durch folgenden Versuch für den Darm bestätigt werden (Versuch 10): Einer nüchternen Katze in Urethan-Narkose wurde der Darm am Pylorus und am Coecum abgeklemmt und in dieses Stück eine Lösung von 1 g Oxychinolinschwefelsäureester injiziert. — Die Substanz verdanke ich ebenfalls der Freundlichkeit von Herrn Professor Neuberg —. Das Tier wurde nach 2 Stunden getötet, der Darm mit 2%iger Essigsäure ausgespült und in der üblichen Weise verarbeitet. 7,79 mg des Esters konnten isoliert werden, daneben fanden sich 2,54 mg Oxychinolin in freiem Zustand. Ungefähr 990 mg des Esters sind in dieser verhältnismäßig kurzen Zeit vom geschädigten Darm resorbiert worden.

Daraus scheint mir hervorzugehen, daß der Schwefelsäureester eine günstige Resorptionsform sein muß, denn eine Umesterung ist in dieser Zeit schwer denkbar. Die gefundene Resorptionsgeschwindigkeit erklärt, daß von gefüttertem Oxychinolin stets nur so wenig aus dem Darm wiedergewonnen werden konnte.

Nachdem durch diese Voruntersuchungen der Befund von Grabbe über die Veresterung des Oxychinolins im Darm, wahrscheinlich mit Sulfat, sichergestellt worden war, konnte an die Aufgabe dieser Arbeit, die Veresterung in vitro zu reproduzieren, gegangen werden.

(Versuch 11). Frisch entnommene Mucosa vom Hundedarm (vom Pylorus bis zum Coecum) wurde mit 0,2 g Natriumsulfat und 7 ccm einer schwach salzsauren Lösung, die 7,49 mg Oxychinolin enthielt, in ein Phosphatpuffergemisch, entsprechend einem p_h von 6,4 gebracht. Die Lösung wurde 231 Stunden im Brutschrank bei 38° stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurde das p_h elektrometrisch nachgeprüft, es betrug 6,6. Die Lösung wurde dann in der üblichen Weise verarbeitet.

Ergebnis, berechnet auf mg Oxychinolin und Sulfat (nicht ausgeschüttelt):

Oxychinolin: frei: 3,22 (= 88% der Eingabe) geb.: 3,34

SO_4: 27,6

Zur Kontrolle dieses Versuches wurde Mucosa vom gleichen Tier in gleicher Weise entnommen, einige Zeit im Brutschrank stehn gelassen und ohne Zusatz von Oxychinolin analysiert. Da hier nur sehr geringe Mengen von brombindender Substanz erwartet werden konnten, wurde gleich hydrolysiert und ausnahmsweise die Gesamtmenge der Phenole bestimmt. Sie betrug: 0,18 mg, berechnet auf mg Oxychinolin, (nicht ausgeschüttelt). (Versuch 12).

In dem Hauptversuch (Versuch 11) wurde also in schwach saurem Gebiet in vitro eine Veresterung durch Zusatz völlig unbehandelter Mucosa erzielt. Das Resultat kann wohl nicht bezweifelt werden, da die Menge brombindender Substanz im Kontrollversuch (Versuch 12) praktisch gleich Null war.

Zu weiteren Versuchen wurde die Mucosa mit Aether-Kohlensäureschnee gefroren und gepulvert. Sie wurde dann nach der Vorschrift von Neuberg (34) zur Darstellung eines sulfatasehaltigen Trockenpräparates weiter verarbeitet. Neuberg und Simon haben die Methode von Albert, Buchner und Rapp (35) für die Herstellung

34. Neuberg und Simon, Biochem. Z. 156, S. 371: Tierische Sulfatase.
35. Albert, Buchner und Rapp, Ber. 35, S. 2376.

von Aceton-Dauerhefe in folgender Weise verändert, und diese Modifikation wurde hier angewandt: Die fein zerschnittenen Gewebe wurden rasch in die etwa 7 fache Menge reinen, frisch über Chlorkalzium destillierten Acetons unter dauerndem Umrühren eingetragen und alsdann 10 Minuten kräftig im Mörser verrieben. Darauf wurde abgesaugt und dieselbe Operation mit der 3 fachen Menge Acetons noch zweimal je 3 Minuten wiederholt. Nach scharfem Abnutschen wurde das Gewebe in die 3 fache Menge absoluten, zuvor über Natrium getrockneten Aethers eingetragen und einige Minuten gründlich verrührt. Das Material wurde wiederum auf die Nutsche gebracht, fest abgepreßt und darauf einige Stunden an der Luft auf Fließpapier getrocknet. Zur Entfernung des vorhandenen Bindegewebes wurde es durch ein Haarsieb mittlerer Feinheit getrieben. Es resultierte ein hellgelbes, staubfeines Pulver.

Die enzymatische Wirkung dieses Präparates soll über längere Zeit erhalten bleiben. Weiter geben Neuberg und Simon an, daß die so erhaltenen Trockenpulver gegenüber den frischen Organen kaum eine schwächere Wirksamkeit zeigen, wenn man die Trockensubstanz des Fermentmaterials in Betracht zieht.

Die spaltende Wirkung der so hergestellten Trockenpräparate ergibt sich aus folgender Tabelle von Neuberg und Simon:

Organmenge g	1% Lösung von aetherschwefelsaurem Salz ccm	Toluolmenge %	Analyse nach Tagen	Als $BaSO_4$ bestimmtes Aethersulfat in 35 ccm Filtrat = 7,0 ccm Urlösung g	Spaltung %
Acetonleber	Phenolsalz				
2,5	150	1	0	0,0732	——
			4	0,0698	4,64
			7	0,0676	7,65
			11	0,0678	7,60
Acetonniere	Phenolsalz				
2,5	150	1	0	0,0723	——
			3	0,0699	3,32
			6	0,0684	5,39
			10	0,0664	8,16

Um zu überprüfen, ob die nach den eben gegebenen Vorschriften aufgearbeitete Darmschleimhaut Sulfatasewirkungen zeigte,

(Versuch 13), wurden 0,1 g des Esters mit 0,5 g dieses Pulvers, 2 g Calciumkarbonat, 2 ccm Toluol und ccm Wasser ad 100 bei 38° im Brutschrank 146 Stunden stehen gelassen. Bestimmt wurde in diesem Versuch nur das freie Oxychinolin.

Freies Oxychinolin 9,6 mg (nicht ausgeschüttelt).
Es sind also ca. 15% gespalten worden.

(Vergleiche die eingangs angeführte Tabelle von Rosenfeld.)

Bei sehr viel energischerer Behandlung zeigte sich, daß die Spaltung von 15% durchaus als Fermentwirkung aufgefaßt werden darf: (Versuch 14). Eine Lösung von 0,052 g Schwefelsäureester wurde ohne Fermentzusatz bikarbonatalkalisch gemacht, eine halbe Stunde gekocht und extrahiert:

Freies Oxychinolin 2,2 mg. (Spaltung nur ca. 6,6%).
(Versuch 15). Eine Lösung von 0,0528 g Schwefelsäureester wurde eine halbe Stunde in gesättigter Kochsalzlösung ohne Ferment unter dauerndem Ersatz des verdampften Wassers gekocht, bikarbonatalkalisch gemacht, 8 Stunden extrahiert und in üblicher Weise titriert. Es ergaben sich:

Freies Oxychinolin 0,66 mg. (also ungefähr eine Spaltung von 2%).

(Versuch 16). Dasselbe Präparat in derselben Menge und mit denselben Zusätzen, also auch mit Ferment, nur, daß statt des Esters 5,35 mg Oxychinolin zugesetzt wurden, wurde bei 38° 171 Stunden im Brutschrank stehen gelassen.

Freies Oxychinolin 4,01 mg., berechnet auf mg. Oxychinolin. (nicht ausgeschüttelt).

Gebundenes Oxychinolin 0,10 mg.

Gebundenes SO_4 war als Bariumsulfat nicht zu finden.
(Es wurden 77% der Eingabe gefunden, davon 75% als freies Phenol.)

Diese Zahl spricht nicht für eine Synthese, Die Spaltung von derartigen Estern durch das geschilderte Präparat im schwach alkalischen Gebiet steht durchaus im Einklang mit den Versuchen von Neuberg. Bemerkenswert ist, daß in diesem Fall, in dem sich kein gebundenes Oxychinolin nachweisen ließ, auch keinerlei gebundenes Sulfat zu finden war.

Dies selbe Mucosepräparat wurde nun in derselben Menge (0,5 g) im sauren Medium auf seine Synthesefähigkeit geprüft:

Tab. II.

Versuchsnummer	zugefügte mg freies Oxychinolin	p_h	gefundene mg freies Oxychinolin
17	10,7	4,976	11,6
18	10,7	5,600	10,6
19	10,7	6,239	11,0

Die Gläschen standen 234 Stunden im Brutschrank, das p_h wurde mit Phosphatpuffern eingestellt. Von einer Veresterung konnte keine Rede sein. Nun wäre es ja denkbar, daß bei der Weiterverarbeitung nach Neuberg das Ferment verloren gegangen sei. Es wurde darum das Präparat, das nur mit Kohlensäureschnee getrocknet worden war, geprüft (Versuch 20 und 21). Hinzugefügt wurde ein Versuch ohne Mucosa (Versuch 22), um die Methode zu überprüfen.

Anmerk.: Alle Gläschen, die in den Brutschrank gestellt wurden, wurden mit Toluol überschichtet, um Fäulnis zu vermeiden.

Ergebnis, berechnet auf mg Oxychinolin:

Tab. III.

Versuchs-Nr.	mg eingewogenes Oxychinolin	Std. im Brutschrank	mg gefund. freies Oxychinolin	mg gefund. verestert. Oxychinolin	Bemerk.
20	20	190	12,45	1,0	
21	20	190	15,38	0,3	Zusatz: 50 mg Takasulfatase
22	20	264	18,50	—	ohne Mucosa

In Nr. 20 und Nr. 21 der vorstehenden Tabelle wurden beide Male 0,1 g Mucosa zugesetzt. Warum in diesen beiden Versuchen die Verluste so groß sind, während der Kontrollversuch (Nr. 22) ein annehmbares Resultat liefert, ist unklar. Es liegt nahe zu denken, daß das Oxychinolin von der Mucosa adsorbiert worden ist. Eine Veresterung merklichen Grades war jedenfalls auch hier nicht nachzuweisen. Bei diesem letzten Versuch wurde das Sulfat nicht in der Form von Natriumsulfat, sondern von mannitschwefelsaurem Calcium (Präparat: „Incalven", chem. Fabrik Helfenberg

[im ccm 0,1057 g Mannitschwefelsäure]) zugesetzt, in der Hoffnung, daß die Energie, die beim Zerfall dieses Esters frei wird, der Veresterung des Oxychinolins zu gute käme.

Die frische Mucosa hat demnach eine Veresterung im schwach sauren Gebiet gegeben, dagegen die weiter verarbeitete Mucosa in keinem Fall und bei keinem untersuchten p_h.

V.

Nach diesen Ergebnissen lag es nahe, die weiteren Veresterungsversuche mit Duodenalsaft anzusetzen. In zwei Versuchen wurde der Duodenalsaft frisch aus einer Fistel eines operierten Hundes, in einigen Versuchen mir selbst unmittelbar vorher mittels Duodenalsonde entnommen. Außerdem wurden zwei Versuche angesetzt, bei denen der Duodenalsaft, der durch Sonde dem Menschen entnommen war, längere Zeit unter Toluol im Eisschrank gestanden hatte.

(Bei der Aufarbeitung dieser letzten Versuche wurde nicht mit Aether extrahiert, sondern mit Petroläther ausgeschüttelt. Da diese Methode aber keinerlei Vorteile bietet, wohl aber gelegentlich große Schwierigkeiten macht, weil dabei mitunter äußerst stabile Emulsionen entstehen, wurde nach Aufarbeitung dieser Versuche die Methode zugunsten der älteren wieder verlassen.)

Tab. IV.

Leerversuche: (Duodenalsaft, Ester, Oxychinolin, sofort auf Eis gestellt).

Versuchs-Nr.	Oxychinolin eingewogen:	Oxychinolin gefunden:	= % der Einwage:	Ester eingewogen:	Ester gefunden:
23	13,8 mg	12,2 mg	88%	11,4 mg	8,9 mg
24	15,4 mg	13,5 mg	88%		

Tab. V.

berechnet auf mg Oxychinolin

Versterungsversuche Oxychinolin und Duodenalsaft:

Versuchs-Nr.	Art des Duodenalsaftes	Std. im Brutschr.	mg Oxychinolin	Incalven ccm	gefunden freies Oxychinolin	gefunden verest. Oxychinolin	gefunden mg Sulfat
25	Hund	68	50	5	5,8	5,9	—
26	Hund	124	20	1	—	1,14	—
27	Mensch	124	20	1	14,58	1,3	4,4

Bemerkungen zu Tab. IV und V:

Die Menge des Duodenalsaftes wurde in allen 5 Versuchen nicht genau gemessen. Sie schwankt zwischen 3 ccm und 5 ccm.

Zu Versuch 25 in Tab. V:

Die großen Verluste sind wohl dadurch zu erklären, daß hier vor der Verarbeitung, als das Glas aus dem Brutschrank kam, filtriert wurde. In diesem Filter, das eine Zeit lang auf dem Laboratoriumstisch aufgehoben war, ließen sich noch 26,3 mg Oxychinolin ermitteln.

Zu Versuch 27 in Tab. V:

Die Menge SO_4 entspricht ungefähr dem fehlenden veresterten Anteil.

Mit dem Duodenalsaft, der im Eisschrank mehrere Wochen gestanden hatte, wurden noch zwei Versuche angesetzt, ein Spaltungsversuch und ein Syntheseversuch mit dem Calciumsalz der Mannitschwefelsäure.

(Versuch 28) Spaltung:

von 12,4 mg Ester fanden sich 2,8 mg frei.

(Versuch 29) Synthese:

von 22,0 mg Oxychinolin und 1 ccm Incalven fanden sich *6,7 mg frei.*

Beiden Gläschen waren 2,5 ccm Duodenalsaft zugesetzt. Sie standen 240 Stunden im Brutschrank.

(Es wurde nur das freie Oxychinolin bestimmt.)

Die Versuche scheinen zu beweisen, daß die Art des zu verwendenden Duodenalsaftes für die Synthesefähigkeit keine große Rolle spielt und daß es daher möglich ist, den Duodenalsaft längere Zeit unter Toluol im Eisschrank aufzuheben. Es wurde, dank der Freundlichkeit von Herrn Professor Dr. Stroebe, in der 2. med. Klinik der Charité über längere Zeit hin Duodenalsaft gesammelt, in ein Gefäß zusammengegossen und von Anfang an unter den beschriebenen Bedingungen aufbewahrt. Die so gewonnene Menge Duodenalsaft wurde für die nächsten Versuche benutzt, (Tab. VI).

Die Ansätze wurden in folgender Weise hergestellt:

In jedes Reagensglas kamen 5 ccm Duodenalsaft, 5 ccm einer salzsauren Lösung vom ph 1,3 (elektrometrisch gemessen), die insgesamt 12,34 mg Oxychinolin enthielt und 0,1 g Natriumsulfat oder 5 ccm Incalven; in einem Fall wurde überhaupt kein sulfathaltiges Präparat hinzugesetzt. Alle Gläschen wurden mit 5 ccm Toluol überschichtet und sofort in den Brutschrank gestellt.

Tab. VI.

berechnet auf mg Oxychinolin.

Vers.-Nr.	Std. bei 38°	Art des zuges. SO_4	Oxychinolin zugesetzt	Oxychinolin gefunden (frei und gebunden) in mg	Oxychinolin gefunden (frei und gebunden) in %	Oxychinolin: gefunden: frei	Oxychinolin: gefunden: geb.
30	190	Incalven	12,34	10,71	87	6,27	4,44
31	190	Sulfat	12,34	13,83	112	8,61	5,22
32	243	Sulfat	12,34	14,29	116	7,65	6,64
33	285	Incalven	12,34	—,—	—	4,98	——
34	285	Sulfat	12,34	11,61	94	9,81	1,80
35	285	———	12,34	12,00	97	4,12	7,88
36	333	Incalven	12,34	7,98	65	4,86	3,12
37	381	Incalven	12,34	12.18	99	5,09	7,09
38	501	Incalven	12,34	7,96	65	4,00	3,96
39	525	Sulfat	12,34	10,14	82	8,22	1,92

Bemerkungen zu Tab. VI:

Bei Versuch 32 kann der Wert für gebundenes Oxychinolin durch einen methodischen Fehler etwas überhöht sein.

Den Versuchen 32 und 39 wurden im Ansatz je 3,9 g Natriumbikarbonat hinzugesetzt.

Aus der Tab. VI ergibt sich, daß die Art des zugefügten Sulfatpräparates keine Rolle spielt, ja, (siehe Versuch 35) sich ein Sulfatzusatz überhaupt erübrigt.

Die Gegenüberstellung der zugesetzten und gefundenen Oxychinolinmengen in Tab. VI zeigt, daß die Methode in quantitativer Hinsicht nicht sehr befriedigt. Aber es geht doch, selbst bei vorsichtigster Bewertung der Analysenresultate, klar aus den zehn Versuchen (30 — 39) der Tab. VI hervor, daß überall eine Veresterung eingetreten ist.

Danach kann wohl kein Zweifel bestehen, daß die Veresterung im Duodenum durch ein Ferment, das sich nur in frisch abgeschabter Mucosa und im Duodenalsaft befindet, bewirkt wird. Späteren Untersuchungen muß es vorbehalten bleiben festzustellen, ob der Duodenalsaft in gleicher Weise spaltend wirkt wie die Sulfatase und ob sich ähnliche Fermentwirkungen, man denke z. B. an die Versuche von Kochs (l. c.), auch mit anderen physiologischen Flüssigkeiten oder Extrakten erzielen lassen. Denn, wie schon im Anfang beschrieben, müssen die Versuche unter Toluol zur Wahrung

der Sterilität ausgeführt werden; dies hatte Kochs ja nicht beachtet.

Es kann in dieser Arbeit nicht bewiesen werden, daß diese Veresterung nur im Duodenum vor sich geht, sondern es kann nur gesagt werden, daß sie dort sicher besteht, und nach der eingangs gegebenen Literaturübersicht kann man wohl mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß der Darm, wenn er schon nicht alle derartigen Synthesen allein bewirkt, wohl doch den Hauptanteil daran hat.

Ein überaus merkwürdiger Nebenbefund ist es, daß diese Fermentwirkung bei Aufarbeitung der Mucosa, auch nach dem Verfahren zur Anreicherung von Sulfatase — Neuberg (l. c.) —, verloren geht.

Ich bin der Ansicht, mit dem vorliegenden Beitrag zu diesem Gebiet, der bewußt an die eingangs referierte alte Literatur anschließt, die Erkenntnis des Vorgangs der Phenolveresterung gefördert und die im Anfang postulierte Aufgabe, wenigstens einen Ort der Synthese sicherzustellen, erfüllt zu haben.

Zusammenfassung.

Der Einzelbefund von Grabbe über das Vorkommen eines Schwefelsäureesters des Oxychinolins im Duodenum nach Oxychinolinfütterung und über die allmähliche Spaltung dieses Esters unter physiologischen Bedingungen konnte bestätigt werden.

Es gelang mit frischer Darmschleimhaut eine Veresterung des Oxychinolins, als Beispiel eines Phenols, mit Schwefelsäure bei 38° im Reagensglas zu erzielen. Dasselbe mißlang bei Zusatz einer Mucosa, die nach verschiedenen Methoden — u. a nach Neuberg — aufgearbeitet war. Unter Zusatz von Duodenalsaft des Menschen und des Hundes tritt regelmäßig eine Veresterung ein.

Danach kann kein Zweifel darüber bestehen, daß Oxychinolin im Duodenum durch ein in das Lumen des Darmes abgeschiedenes Ferment verestert wird. Ueber die Natur des Fermentes kann bisher nichts weiter ausgesagt werden.

Lebenslauf.

Am 8. Oktober 1910 wurde ich in Berlin als Sohn des Rechtsanwalts und Notars Hans Marquardt geboren.

Meine Schulausbildung erhielt ich in Berlin am Friedrich-Werderschen Gymnasium und am staatlichen Gymnasium in Göttingen.

Ich studierte in Göttingen, Marburg und Berlin, wo ich am 13. Juni 1936 das medizinische Staatsexamen bestand.

An den Universitäten Marburg und Berlin legte ich die Verbandsprüfungen für Chemiker ab. Die Bestallung als Arzt erhielt ich am 1. Juli 1937.